

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. März 2006 (16.03.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/026977 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/001574

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2005 (08.09.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 043 782.3
8. September 2004 (08.09.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF** [DE/DE]; Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KORTH, Carsten** [DE/DE]; Fürstenwall 57, 40219 Düsseldorf (DE). **LE-LIVELD, Sirik, Rutger** [DE/DE]; Bilker Allee 126, 40217 Düsseldorf (DE).

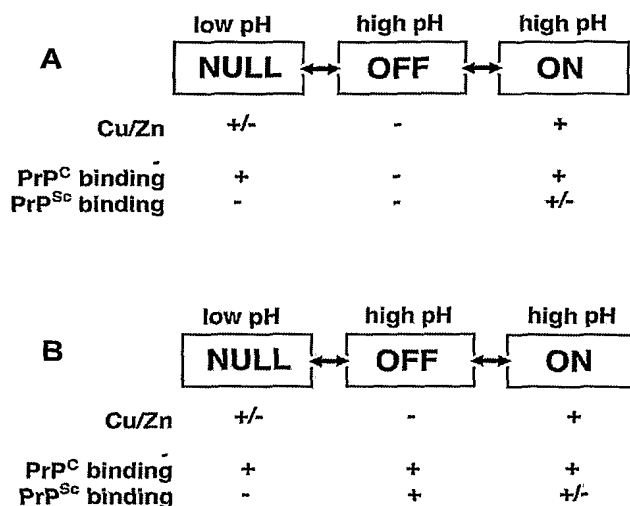
(74) Anwalt: **REMUS, Alvaro**; Mörsenbroicher Weg 200, 40470 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: POLYPEPTIDES AND METHOD FOR SPECIFICALLY BINDING PRIONS

(54) Bezeichnung: POLYPEPTIDE UND VERFAHREN ZUR SPEZIFISCHEN BILDUNG VON PRIONEN



(57) Abstract: The invention relates to polypeptides that have at least one sequence motif and that specifically bind to the pathological isoform of a prion protein. The invention also relates to the uses thereof and to a method for specifically binding the pathological isoform of a prion protein (PrP^{Sc}) to a biomolecule, whereby binding is carried out by incubation of the biomolecule with a sample to be tested for the presence of the pathological prion protein. The sequence motif consists of at least 9 subsequent octamers of an amino acid sequence that is at least homologous to and/or overlaps a copper-binding, repetitive octamer of a prion protein (PrP) and additionally contains a soluble component. The binding sequence motif practically is a sort of switch which controls the binding properties for PrP^C and PrP^{Sc} depending on the metal ion concentration and pH. The polypeptide or sequence motif can have different positions or conformations: NULL (pH ~ 4.5), OFF (without Cu/Zn, pH 7.5) or ON (with Cu/Zn, pH 7.5). Depending on the conditions, the sequence motif PrP^C or PrP^{Sc} has either weak (+/-),

strong (+) or no (-) binding capacity. (A = normal peptide, B = inventive polypeptide or sequence motif having 14 octamers).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Polypeptide mit mindestens einem Sequenzmotiv, die spezifisch an die pathologische Isoform eines Prionproteins binden, sowie deren Verwendungen und ein Verfahren zur spezifischen Bindung der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) an ein Biomolekül, wobei die Bindung durch Inkubation des Biomoleküls mit einer auf die Anwesenheit des pathologischen Prionproteins zu untersuchenden Probe durchgeführt wird. Das Sequenzmotiv besteht aus mindestens 9 aufeinanderfolgenden Octameren einer mit dem Kupferbindenden, repetitiven Octamer eines Prionproteins (PrP) zumindest homologen und/oder überlappenden Aminosäuresequenz, und enthält zusätzlich einen löslichen Bestandteil. Das bindende Sequenzmotiv stellt praktisch eine Art Schalter dar, der die Bindungseigenschaften für PrP^C und PrP^{Sc} in Abhängigkeit von Metallionen- Konzentration und pH-Wert steuert. Das Polypeptid bzw. Sequenzmotiv kann dabei unterschiedliche Stellungen bzw. Konformationen annehmen: NULL (pH ~4.5), OFF (ohne Cu/Zn, pH 7.5) oder ON (mit Cu/Zn, pH 7.5). In Abhängigkeit von den Bedingungen kann das Sequenzmotiv PrP^C oder PrP^{Sc}

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Polypeptide und Verfahren zur spezifischen Bindung von Prionen

Hintergrund der Erfindung

5 Die Erfindung betrifft Polypeptide mit mindestens einem Sequenzmotiv, die spezifisch an die pathologische Isoform eines Prionproteins binden. Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuren, die für diese Polypeptide kodieren, sowie Vektoren und Zellen, die diese Moleküle enthalten. Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein antigenbindendes Peptid, das spezifisch an die Polypeptide bindet. Die Erfindung
10 betrifft ferner einen Kit und eine pharmazeutische Zusammensetzung, sowie deren Verwendungen, und ein Verfahren zur spezifischen Bindung der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{sc}) an ein Biomolekül, wobei die Bindung durch Inkubation des Biomoleküls mit einer auf die Anwesenheit des pathologischen Prionproteins zu untersuchenden Probe durchgeführt wird.

15

Übertragbare spongiforme Enzephalopathien wie beispielsweise die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen, Scrapie bei Schafen und Ziegen, CWD bei Hirschen sowie BSE bei Rindern sind neurodegenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die sich durch lange Inkubationszeiten auszeichnen
20 und auch artübergreifend übertragen werden können. Der Erreger dieser Erkrankungen, das Prion, ist ein infektiöses Molekül, das aus der fehlgefalteten Isoform eines normalen Prionproteins (PrP) besteht und während des Krankheitsverlaufes in zunehmendem Maße das physiologische Prionprotein (PrP^{c}) in die pathogene, fehlgefaltete Isoform (PrP^{sc}) konvertiert. Das
25 pathologische bzw. pathogene Prionprotein (PrP^{sc}) stimmt hinsichtlich des Molekulargewichts und der Aminosäuresequenz mit dem normalen Wirtsprotein (PrP^{c}) überein. PrP^{c} weist aber überwiegend α -helikale Sekundärstrukturen auf, ist löslich und mittels Protease verdaubar. PrP^{sc} weist dagegen hauptsächlich β -Faltblattstrukturen auf, ist unlöslich und kann von Proteasen nur in geringem Maße
30 abgebaut werden. Allerdings wurde auch Protease-sensitives PrP^{sc} beschrieben (Safar et al., 1998). Die pathogene Isoform PrP^{sc} ist in der Lage, das physiologische PrP^{c} durch einen bisher unbekannten Mechanismus in die pathologische Isoform PrP^{sc} zu konvertieren, d. h. die Faltung bzw. Sekundärstruktur des Prionproteins zu ändern.

Stand der Technik

Die N-terminale Domäne des Prionproteins enthält vier hochkonservierte Kupferbindende Octamere (Octarepeats), wie beispielsweise die Aminosäuresequenz Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln von Position 60 bis 91 der Aminosäuresequenz des Prionproteins des syrischen Hamsters (Burns et al., 2003). Diese Octarepeat-Region bindet Kupfer kooperativ (Brown et al., 1997; Garnett und Viles, 2003; Hornshaw et al., 1995; Stöckel et al., 1998) und ändert durch die Bindung von Kupfer seine Konformation (Viles et al., 1999). Es konnte ferner gezeigt werden, dass das Einführen zusätzlicher Octamere in die Octarepeat-Region (expanded octarepeats) mit der genetisch bedingten Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, d.h. der spontanen nicht-infektiösen Form der Erkrankung, in Verbindung steht, wobei die zusätzlichen Octamere die Wahrscheinlichkeit der spontanen Konversion von nativem PrP^c in die pathologische Form erhöht (Campbell et al., 1996; Collinge et al., 1992; Owen et al., 1989). Spätere Untersuchungen zur Rolle der verlängerten Octarepeat – Domain wurden an dem entsprechenden Homologen des Maus PrP (MoPrP-14OR) durchgeführt (Chiesa et al., 1998; Chiesa et al., 2000).

Aufgrund der artübergreifenden Übertragbarkeit der Erkrankungen, beispielweise vom Rind (BSE) auf den Menschen (vCJD) werden in Schlachthöfen post mortem - Tests auf das Vorhandensein der pathologischen Erreger in geschlachteten Tieren durchgeführt, damit infizierte Tiere nicht in die Nahrungskette gelangen können. Da die Übertragung der Erkrankungen auch über infiziertes Blut erfolgen kann, wäre es ferner wünschenswert, einen Frühtest (ante mortem) zur Untersuchung von Körperflüssigkeiten zur Verfügung zu stellen oder eine effektive Methode zur Untersuchung von Blutproben zu schaffen, um infizierte, subklinische Patienten zu identifizieren und beispielsweise deren Blut im Falle einer Blutspende aussortieren zu können.

Aus der WO 01/00235 A1 sind beispielsweise isolierte Zelloberflächenproteine bekannt, die Prionproteine binden. Es wird vorgeschlagen, diese Proteine zur Diagnose und Therapie von durch Prione hervorgerufene Erkrankungen zu verwenden.

Aus der EP 0 822 828 B1 ist ebenfalls ein isoliertes Protein bekannt, das an Prionproteine bindet. Die aus 17 Aminosäureresten bestehende Aminosäuresequenz Tyr-His-Val-Ala-Thr-Lys-Ala-Pro-His-His-Gly-Pro-Cys-Arg-Ser-Ser-Ala, die in dem Protein enthalten ist, kann als isoliertes Peptid zur Bindung von Prionproteinen verwendet werden.

Aus der EP 0 616 613 B1 sind Fragmente von Prionproteinen mit zumindest einer antigenen Domäne eines Prionproteins bekannt. Die Fragmente werden in Form synthetischer Polypeptide beschrieben, wobei zahlreiche antigene Aminosäuresequenzen innerhalb dieser Polypeptide offenbart sind. Mit Hilfe der beschriebenen synthetischen Polypeptide können Prionproteine oder Antikörper gegen Prionproteine nachgewiesen werden.

Die DE 199 17 838 A1 offenbart ein Oligopeptid der Aminosäuresequenz Met-Ile-Phe-Ile-Val-Ala-Glu-Arg-Arg-Gln-Gly-Val-Leu-Thr-Leu-Gly-Ala-Val, das zur Diagnose und therapeutischen Behandlung von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien und ähnlichen neurodegenerativen Erkrankungen verwendet werden kann.

Aus der DE 197 41 607 A1 sind ferner synthetische Polypeptide zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen bekannt, welche immunogene Eigenschaften bzw. Bindungseigenschaften aufweisen, die denen des PrP^{sc} entsprechen, welche jedoch nicht infektiös sind. Die Polypeptide enthalten zumindest eine Sequenz, die im nativen PrP^{sc} an dessen Oberfläche angeordnet sind und dort eine Bindungsstelle bilden. Es sind in diesem Zusammenhang verschiedene Aminosäuresequenzen offenbart, die in den synthetischen Polypeptiden enthalten sein können. Eine dieser Aminosäuresequenzen ist beispielsweise die Sequenz Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly, die einer Sequenz aus der Octarepeat-Region eines Prionproteins entspricht. Es wird vorgeschlagen, mittels der beschriebenen Polypeptide in Probenmaterial möglicherweise enthaltenes PrP^{sc} spezifisch zu binden und anschließend durch geeignete Tests nachzuweisen. Es wird ferner vorgeschlagen, die Polypeptide zu therapeutischen Zwecken einzusetzen.

Die im genannten Stand der Technik beschriebenen Polypeptide weisen allerdings keine ausreichende Spezifität für das pathologische PrP^{Sc} auf, so dass eine zuverlässige Unterscheidung zwischen der pathogenen Isoform und dem normalen Wirtsprotein (PrP^C) nicht mit ausreichender Zuverlässigkeit möglich ist.

- 5 Darüber hinaus ist die Bindung an das PrP^{Sc} jeweils relativ schwach und nicht mit der Stabilität einer Bindung beispielsweise durch Antikörper vergleichbar.

Zusammenfassung der Erfindung

- 10 Aufgabe der Erfindung ist es daher, Polypeptide und Verfahren zur Verfügung zu stellen, welche die spezifische Bindung der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) und somit eine eindeutige Unterscheidung zwischen dieser und der normal gefalteten Isoform des Prionproteins (PrP^C) zuverlässig ermöglichen.

15

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Polypeptide der eingangs genannten Art gelöst, bei denen das mindestens eine Sequenzmotiv aus mindestens 9 aufeinanderfolgenden Octameren einer mit dem Kupfer-bindenden, repetitiven Octamer eines Prionproteins (PrP) zumindest homologen und/oder überlappenden

20

Aminosäuresequenz besteht, und das zusätzlich einen löslichen Bestandteil enthält. Es konnte überraschender Weise gezeigt werden, dass solche Polypeptide unter definierten Bedingungen sehr spezifisch und äußerst stabil an die krankheitsspezifische Isoform PrP^{Sc} binden. Die Bindung an das PrP^{Sc} ist dabei durch Zugabe einer chelatbildenden Substanz, beispielsweise EDTA,

25

induzierbar, so dass die erfindungsgemäßen Polypeptide sehr gezielt und steuerbar eingesetzt werden können. In Abwesenheit divalenter Kationen bzw. der

Anwesenheit eines entsprechenden Chelators und bei physiologischem pH-Wert binden die erfindungsgemäßen Polypeptide PrP^{Sc} mit sehr hoher Assoziationskonstante, während PrP^C unter diesen Bedingungen nur schwach

30

gebunden wird, so dass PrP^{Sc} nach differentiellm Waschen spezifisch detektiert werden kann. Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Polypeptide liegt dabei darin, dass im Gegensatz zu den bisher bekannten Nachweisverfahren für PrP^{Sc} auf die Behandlung der Proben mit Protease verzichtet werden kann. Hierdurch werden die entsprechenden Nachweisverfahren deutlich sensitiver und

zudem vereinfacht. Die mit steigender Zahl der Octamere zunehmende Unlöslichkeit des Sequenzmotivs wird durch die Fusion mit einem löslichen Bestandteil kompensiert, so dass insgesamt ein lösliches Polypeptid vorliegt, das zur Verwendung in standardisierten Testverfahren geeignet ist. Eine Verlängerung des Sequenzmotivs, d.h. eine Erhöhung der Anzahl der Octamere, führt dabei bis zu dem Punkt zu einer Erhöhung der Spezifität der erfindungsgemäßen Polypeptide, an dem die Polypeptide unlöslich bzw. nicht mehr handhabbar oder schwer herstellbar werden. Die erfindungsgemäßen Polypeptide ermöglichen also eine zuverlässige Unterscheidung zwischen der pathogenen Isoform (PrP^{Sc}) und dem normalen Wirtsprotein (PrP^C) und können somit insbesondere zur Diagnose von spongiformen Enzephalopathien, beispielsweise zum Nachweis von PrP^{Sc} in Blutproben, eingesetzt werden. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Polypeptide können beispielsweise Schnelltests an einer großen Anzahl von Tieren durchgeführt werden (Herdenuntersuchungen). Dabei kann die Untersuchung auf das Vorliegen einer Infektion mit PrP^{Sc} in einem frühen Stadium erfolgen (ante mortem), d.h. nicht nur an Hirnhomogenaten, sondern beispielsweise auch an Proben von Körperflüssigkeiten. Durch die Stärke der Bindung des PrP^{Sc} können mit Hilfe der erfindungsgemäßen Polypeptide Proben, beispielsweise Blutkonserven, ferner vollständig von den pathogenen Prionproteinen gereinigt werden. Es wäre auch denkbar, die erfindungsgemäßen Polypeptide, die zu diesem Zweck mit einer geeigneten Substanz gekoppelt sein müssten, einer zu untersuchenden Person zu applizieren und in einem bildgebenden (Imaging) Verfahren zur in vivo - Diagnostik, wie beispielsweise NMR-Spektroskopie, zu nutzen. In diesem Fall könnten neben den L-Formen der Polypeptide auch die D-Formen (Enantiomere) eingesetzt werden.

Die Octamere der erfindungsgemäßen Polypeptide, die als repetitive Sequenz das für die Bindung an PrP^{Sc} essentielle Sequenzmotiv bilden, sind Homologe der Kupfer-bindenden, repetitiven Octamere natürlicher Prionproteine (PrP) und/oder überlappen mit deren Aminosäuresequenz. Die Octamere des Prionproteins (PrP) haben dabei die Grundsequenz Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln, wobei innerhalb der repetitiven Sequenz, d.h. der 4 Octarepeats, der Startpunkt der sich wiederholenden Sequenz variieren kann. Erfindungsgemäße Octamere können daher alle aus der Sequenz Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-

Gly-Gly-Gly ausschneidbaren Octamere sein. Homologe Octamere im Sinne der Erfindung sind dabei alle Octamere, die sich von der entsprechenden Sequenz eines natürlichen Prionproteins durch den Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren unterscheiden, wobei die Struktur und/oder Funktionalität des Sequenzmotivs erhalten bleibt. Beispielsweise kann in einem oder mehreren Oligomer(en) die Aminosäure nach dem zweiten Glycin - Rest entweder Glycin oder Serin sein.

Zumindest ein Octamer der erfindungsgemäßen Polypeptide ist vorzugsweise aus der Gruppe der Aminosäuresequenzen gemäß Seq ID Nrn. 9 bis 24 ausgewählt. Dabei können innerhalb des Sequenzmotivs entweder gleiche Oligomere repetitiv miteinander verbunden oder unterschiedliche Oligomere miteinander kombiniert sein.

Vorzugsweise ist die Struktur der erfindungsgemäßen Polypeptide derart ausgebildet, dass sie spezifisch an eine der Aminosäuresequenzen Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp, Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp oder Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly, oder eine sich, vorzugsweise 4-mal, wiederholende Abfolge einer dieser Sequenzen bindet. Diese Sequenzbereiche innerhalb der Octarepeat-Region des PrP^{Sc} haben sich als bevorzugte Bindungsstellen für die erfindungsgemäßen Polypeptide erwiesen. Folglich ist die Interaktion des Sequenzmotivs der erfindungsgemäßen Polypeptide mit diesen Sequenzen für die spezifische Bindung des PrP^{Sc} von besonderer Bedeutung.

Um eine ausreichend hohe Assoziationskonstante der Bindung an PrP^{Sc} zu gewährleisten, sollte das Sequenzmotiv in bevorzugter Ausgestaltung der Erfindung aus 10 bis 32, vorzugsweise 14 oder 16, Octameren bestehen. Eine solch hohe Anzahl von Octarepeats ist für die spezifische Unterscheidung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} besonders vorteilhaft, wobei die Spezifität der erfindungsgemäßen Polypeptide mit steigender Anzahl von Octameren verbessert werden kann.

Als besonders vorteilhaft für die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Polypeptide hat sich ferner herausgestellt, dass der lösliche Bestandteil Glutathion-S-Transferase (GST) ist.

- 5 Erfindungsgemäß bevorzugt sind dabei Polypeptide, die mit einer der Aminosäuresequenzen gemäß Seq ID Nrn. 1 bis 8 zumindest 90 % Homologie aufweisen.

10 Wenn ein zusätzlich gebundener, detektierbarer Bestandteil, vorzugsweise ein fluoreszierender, radioaktiver oder enzymatisch nachweisbarer Bestandteil, in dem erfindungsgemäßen Polypeptid enthalten ist, kann dieses auf einfache Art und Weise mit Hilfe von standardisierten Methoden detektiert und somit in jeder Form von Nachweisverfahren verwendet werden.

- 15 Die Erfindung umfasst ferner ein Nukleinsäuremolekül, mit einer Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid kodiert, wobei die Nukleotidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- 20 a) einer isolierten oder künstlichen Nukleotidsequenz, welche für das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert,
- b) einer Nukleotidsequenz, die zusätzlich zu einer Sequenz, die für ein lösliches Polypeptid kodiert, zumindest 9 aufeinanderfolgende Abschnitte gemäß Seq ID Nr. 25 als Insert enthält, und
- 25 c) einer Nukleotidsequenz, welche sich von den Nukleotidsequenzen gemäß a) oder b) durch den Austausch zumindest eines Codons gegen ein synonymes Codon unterscheidet.

30 Da es aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes möglich ist, bestimmte Codons durch andere Codons zu ersetzen, welche für die gleiche Aminosäure kodieren, ist die Erfindung nicht auf ein spezifisches Nukleinsäuremolekül beschränkt, das für ein Polypeptid gemäß der Erfindung kodiert, sondern schließt alle Nukleinsäuremoleküle ein, die für ein funktionelles Polypeptid kodieren. Die Erfindung schließt ferner Nukleinsäuremoleküle ein, die sich aufgrund von

alternativem Splicing eines gemeinsamen prä-mRNA Moleküls von der als "Wildtyp" anerkannten Sequenz unterscheiden. Derartige Splicing-Mechanismen umfassen die alternative Verwendung von Exons, d.h. Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäuresequenz kodieren, die alternative Anordnung von Exons sowie das "nicht-Entfernen" von Introns, d.h. intervenierenden Sequenzen, die normalerweise nicht für eine Aminosäuresequenz kodieren, aus dem mRNA-Molekül.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können "operativ" mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft sein, um die Expression des Nukleinsäuremoleküls zu ermöglichen. Ein Nukleinsäuremolekül wird als "fähig zur Expression einer Nukleinsäuresequenz" bezeichnet, wenn es Sequenzelemente umfasst, die Informationen hinsichtlich der Regulation von Transkription und/oder Translation enthalten, und diese Elemente "operativ" mit der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sind. Eine operative Verknüpfung ist eine Verknüpfung, bei der die regulatorischen Sequenzelemente und die proteinkodierende Sequenz derart verbunden sind, dass Genexpression möglich ist. Die genaue Beschaffenheit der zur Genexpression erforderlichen regulatorischen Bereiche kann zwischen verschiedenen Spezies variieren. In der Regel umfassen diese Bereiche jedoch einen Promotor, der in Prokaryonten aus dem Promotor *per se* besteht, d.h. DNA-Elemente, welche die Transkriptionsinitiation steuern, sowie aus DNA-Elementen, die nach ihrer Transkription in mRNA den Beginn der Translation regulieren. Solche Promotoren schließen normalerweise 5' nicht-kodierende Sequenzen ein, die an der Initiation von Transkription und Translation beteiligt sind, wie zum Beispiel die -35/-10-Elemente und das Shine-Dalgarno Element in Prokaryonten oder die TATA-Box, CAAT-Sequenzen und 5'-Capping-Elemente in Eukaryonten. Diese Regionen können ferner auch Enhancer- oder Repressorelemente enthalten sowie translatierte Signalsequenzen, um die native Polypeptidkette in ein spezielles Kompartiment der Wirtszelle zu dirigieren. Zusätzlich können auch die 3' nicht-kodierenden Regionen regulatorische Elemente enthalten, die an der Termination der Transkription, der Polyadenylierung und ähnlichem beteiligt sind. Falls diese Terminationssequenzen in einer speziellen Wirtszelle nicht oder nur unzureichend funktionell sind, können sie durch Signale ersetzt werden, die in der betreffenden

Zelle ausreichend funktionell sind. Ein Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung kann demnach eine regulatorische Sequenz, insbesondere eine Promotorsequenz umfassen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst das Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung eine Promotorsequenz sowie eine
5 Transkriptionsterminationssequenz. Geeignete prokaryontische Promotoren sind zum Beispiel der *lacUV5*-Promotor oder der T7-Promotor. Beispiele für geeignete eukaryontische Promotoren sind der SV40-Promotor oder der CMV-Promotor.

Die Nukleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung können ferner in einem Vektor
10 oder einem anderen Klonierungsvehikel enthalten sein, wie zum Beispiel Phagen, Phagemiden, Cosmiden, Baculoviren oder künstlichen Chromosomen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleinsäuremolekül in einem Vektor enthalten, insbesondere in einem Expressionsvektor. Ein derartiger Expressionsvektor kann neben den oben bereits beschriebenen regulatorischen
15 Sequenzen und der Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid umfassen, die von einem Organismus stammen, der mit dem zur Expression verwendeten Wirt kompatibel ist, sowie weiterhin mindestens einen Selektionsmarker, der einen selektierbaren Phänotyp auf eine transformierte Zelle überträgt, umfassen. Eine große Zahl geeigneter Vektoren, z.B. pBluescript, pUC18, pET oder pcDNA3, ist
20 detailliert beschrieben und kommerziell erhältlich.

DNA-Moleküle, die für ein Polypeptid gemäß der Erfindung kodieren, und insbesondere ein Vektor, der die kodierende Sequenz eines solchen Polypeptids enthält, können in eine Zelle transformiert werden, die zur Expression dieser DNA-
25 Moleküle geeignet ist. Die Transformation kann dabei mit Hilfe etablierter Standardverfahren durchgeführt werden. Die Erfindung betrifft daher auch eine Zelle, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder einen dieses enthaltenden Vektor enthält.

Die transformierten Wirtszellen werden unter Bedingungen kultiviert, die zur
30 Expression der Nukleotidsequenzen, die für ein Polypeptid gemäß der Erfindung kodieren, geeignet sind. Die verwendeten Wirtszellen können prokaryontischen Ursprungs sein, wie z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*) oder *Bacillus subtilis*, oder eukaryontischen Ursprungs, wie etwa *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*,

SF9 oder High5 Insektenzellen, immortalisierte Säugetierzelllinien (z.B. HeLa-Zellen oder CHO-Zellen) oder primäre Säugetierzellen.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können beispielsweise mittels eines
5 Verfahrens hergestellt werden, dass die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Klonieren eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls in einen geeigneten Vektor, und
- (b) Einbringen des rekombinanten Vektors in eine geeignete Wirtszelle oder
10 einen geeigneten Zellextrakt.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können aber auch synthetisch hergestellt werden.

Schritt (a) kann dabei mit einem Nukleinsäuremolekül durchgeführt werden, das nur für das Polypeptid kodiert. Alternativ kann er aber auch mit einem Nukleinsäuremolekül durchgeführt werden, in dem das Polypeptid operativ mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft ist. Optional kann das Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung auch mit einem Fusionspartner
20 verknüpft sein, wie etwa einem Affinitätsepitop, das eine einfache Reinigung und/oder Detektion des rekombinanten Proteins erlaubt. Die Expression der so klonierten Nukleinsäuremoleküle kann in einer rekombinanten Zelle oder einem Zellextrakt erfolgen, die/der alle für die Transkription und Translation erforderlichen Faktoren enthält.

Die Erfindung umfasst auch ein antigenbindendes Peptid, insbesondere Antikörper oder Fragmente von Antikörpern, welches spezifisch an das erfindungsgemäße Polypeptid bindet. Bevorzugt sind dabei monoklonale Antikörper sowie entsprechende F_{ab} - bzw. scFv-Fragmente, mit denen die erfindungsgemäßen
30 Polypeptide spezifisch nachgewiesen werden können.

Die Erfindung umfasst ferner ein Kit, welches das Polypeptid nach der Erfindung, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, einen dieses enthaltenden Vektor, zumindest eine Zelle, wie oben beschrieben, und/oder das antigenbindendes

Peptid enthält. Ein solcher Kit wird vorzugsweise zum Nachweis der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) verwendet, beispielsweise in Form eines „ante mortem“- Schnelltests zur Herdenuntersuchung.

- 5 Die Erfindung umfasst ebenfalls eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche das erfindungsgemäße Polypeptid, das Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung, einen dieses enthaltenden Vektor und/oder das antigenbindende Peptid, sowie vorzugsweise übliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe, enthält. Die pharmazeutischen Zusammensetzung wird bevorzugt zur therapeutischen oder
10 präventiven Behandlung von spongiformen Enzephalopathien verwendet.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß ferner durch ein Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, bei dem als Biomolekül zumindest das Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids eingesetzt wird und bei dem die Inkubation unter
15 Anwesenheit einer chelatbildenden Substanz erfolgt, wobei die Fraktion der Probe mit dem gebundenen pathologischen Prionprotein (PrP^{Sc}) anschließend von der Fraktion der Probe mit gebundenen normalen Prionprotein (PrP^{C}) getrennt wird. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem die Biomoleküle spezifisch und sehr stabil an die krankheitsspezifische Isoform PrP^{Sc} binden, kann die
20 pathologische Form des Prionproteins spezifisch und zuverlässig nachgewiesen werden. Die Bindung der Biomoleküle an das PrP^{Sc} ist dabei durch die Zugabe der chelatbildenden Substanz, d. h. also durch das Abfangen von Metallionen, induzierbar. Das erfindungsgemäße Verfahren ist damit selektiv und gezielt steuerbar. In Abwesenheit divalenter Kationen und bei physiologischem pH-Wert
25 bindet das Sequenzmotiv der erfindungsgemäßen Polypeptide PrP^{Sc} mit sehr hoher Assoziationskonstante, während PrP^{C} unter diesen Bedingungen nur schwach gebunden wird, so dass PrP^{Sc} beispielsweise nach differentiellem Waschen, d.h. der Behandlung mit einer definierten Waschlösung, spezifisch detektiert werden kann. Das Waschen sollte dabei unter harschen Bedingungen
30 erfolgen, d.h. Bedingungen, unter denen gebundenes PrP^{C} vollständig ausgewaschen wird, während die Bindung an das PrP^{Sc} erhalten bleibt. Aufgrund der besonders starken Bindung des PrP^{Sc} durch das Sequenzmotiv der erfindungsgemäßen Polypeptide ist eine Trennung der Fraktionen unter sehr stringenten Bedingungen möglich, was die Spezifität des Verfahrens in

vorteilhafter Weise erhöht. Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt auch darin, dass im Gegensatz zu den bisher bekannten Nachweisverfahren für PrP^{Sc} auf die Behandlung der Proben mit Protease verzichtet werden kann. Hierdurch wird das erfindungsgemäße Verfahren deutlich vereinfacht und zudem kostengünstiger. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht also eine zuverlässige Unterscheidung zwischen der pathogenen Isoform (PrP^{Sc}) und dem normalen Wirtsprotein (PrP^C) und dient somit insbesondere der Diagnose von spongiformen Enzephalopathien, beispielsweise dem Nachweis von PrP^{Sc} in Blutproben. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können beispielsweise Schnelltests an einer großen Anzahl von Tieren durchgeführt werden (Herdenuntersuchungen). Dabei kann die Untersuchung auf das Vorliegen einer Infektion mit PrP^{Sc} in einem frühen Stadium erfolgen (ante mortem), d.h. nicht nur an Hirnhomogenaten, sondern beispielsweise auch an Proben von Körperflüssigkeiten. Es wäre auch denkbar, das erfindungsgemäße Verfahren in Form eines bildgebenden (Imaging) Verfahrens zur in vivo - Diagnostik, wie beispielsweise NMR-Spektroskopie, zu nutzen. Als Biomoleküle werden dabei entweder die erfindungsgemäßen Polypeptide oder andere Moleküle eingesetzt, die zumindest das bindungsspezifische Sequenzmotiv der erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten.

In bevorzugter Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass als chelatbildende Substanz ein Komplexbildner für divalente Kationen, vorzugsweise Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), zugegeben wird. Durch das Abfangen der Metallionen, insbesondere von Cu²⁺ - Ionen oder Zn²⁺ - Ionen, wird die Spezifität des Verfahrens in vorteilhafter Weise induziert, so dass die pathologische Isoform des Prionproteins (PrP^{Sc}) gezielt nachgewiesen werden kann.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, die Trennung der Fraktionen durch Waschen mit einer Lösung durchzuführen, die 0,1 bis 2,0 % Natriumdodecylsulfat (SDS), vorzugsweise 0,5 % SDS, und/oder 1 bis 10 mol/l Harnstoff enthält.

In weiterer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass das durch das Biomolekül gebundene Prionprotein durch die anschließende spezifische Bindung eines detektierbaren Moleküls nachgewiesen wird oder dass das durch das Prionprotein gebundene Biomolekül durch die anschließende
5 spezifische Bindung eines detektierbaren Moleküls, insbesondere des antigenbindenden Peptids gemäß der Erfindung, nachgewiesen wird. Das detektierbare Molekül ist dabei vorzugsweise ein, insbesondere monoklonaler, Antikörper oder ein Fragment eines Antikörpers, der/das spezifisch an das Prionprotein oder das Biomolekül bindet. Das detektierbare Molekül kann
10 entweder spezifisch an das Biomolekül oder das Prionprotein binden. Bevorzugt erfolgt der Nachweis des pathologischen Prionproteins (PrP^{Sc}) dabei mittels ELISA oder Dipstick-Technologie.

Das pathologische Prionprotein (PrP^{Sc}) kann durch die Bindung an das,
15 vorzugsweise immobilisierte, Biomolekül beispielsweise auch konzentriert oder aufgereinigt werden. Das Biomolekül wird dabei in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung an ein geeignetes Säulenmaterial, eine Membran, Sepharose-Kügelchen (beads) oder Ähnliches gekoppelt, so dass auch größere Volumina der zu entsprechenden Probe behandelt werden können. Auf diese Weise können
20 beispielsweise auch Blutproben vollständig von den pathogenen Prionproteinen gereinigt werden. Außerdem ist es möglich, größere Mengen des PrP^{Sc} zu reinigen, die dann zur Strukturbestimmung eingesetzt werden können.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird
25 die Bindung des Prionproteins an das Biomolekül bei einem pH-Wert > 7 , vorzugsweise pH 7,5, durchgeführt, da bei niedrigem pH-Wert keine Bindung erfolgt bzw. diese schwächer wird.

Das Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids kann in immobilisierter
30 Form zum Nachweis der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) oder zur Reinigung einer mit der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) infizierten Probe verwendet werden. Da bei Immobilisierung des Sequenzmotivs die Löslichkeit desselben keinen besonderen Einfluss auf die Funktionalität des

Peptids hat, kann bei entsprechenden Anwendungen auf die Fusion mit einem löslichen Peptid verzichtet werden. Die Immobilisierung kann beispielsweise durch die Kopplung an ein geeignetes Säulenmaterial, eine Membran, Sepharose-Kügelchen (beads) oder Ähnliches erfolgen. Auf diese Weise immobilisierte
5 Peptide können zum Nachweis von Prionerkrankungen oder der Reinigung von mit Prionproteinen infiziertem Material verwendet werden.

Zu den sensitivsten Tests für Prionen gehören Bioassays. Diese werden bisher ausschließlich in geeigneten Tieren durchgeführt, da Zellkulturassays aus
10 unbekannten Gründen bisher ungeeignet sind. Da die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Sequenzmotive die PrP^{Sc} - Konformation stabilisieren, können diese beispielsweise auch als Co-Faktoren benutzt werden, um die Sensitivität von Bioassays zu verbessern und auch die Durchführung von Assays in Zellkulturen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck werden erfindungsgemäße
15 Polypeptide bzw. Sequenzmotive mit neun oder mehr Octameren (vorzugsweise > 10OR) dem Inokulum hinzugefügt und dann in geeignete Tiere oder Zellkulturen inokuliert. Im Gegensatz zu Inokula ohne Peptide mit erweiterter Octarepeat-Region haben die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Sequenzmotive eine kürzere Inkubationszeit und können somit höher verdünnt werden (Infektionstiter).
20 Eine besonders vorteilhafte Verwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder des Sequenzmotivs eines erfindungsgemäßen Polypeptids liegt daher in einer Erhöhung der Sensitivität von Bioassays.

Das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder das Sequenzmotiv des
25 erfindungsgemäßen Polypeptids kann in einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ferner zum Nachweis einer Subpopulation der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) oder zur Reinigung einer mit einer Subpopulation der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) infizierten Probe verwendet werden. Überraschender Weise binden zumindest einige der erfindungsgemäßen
30 Polypeptide ausschließlich einen geringen Anteil der Gesamtmenge des Proteinase K-stabilen PrP^{Sc} in einer Probe. Insbesondere das erfindungsgemäße Polypeptid mit 16 Octameren (GST-16OR) bindet spezifisch eine Subpopulation des PrP^{Sc}, die eindeutig mit der Infektiosität korreliert ist. Folglich kann das

erfindungsgemäße Polypeptid bzw. Sequenzmotiv in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung auch für den spezifischen Nachweis besonderer Subpopulationen des PrP^{Sc} verwendet werden.

5 Beispiel

Klonierung und Expression von Glutathion-S-Transferase (GST), die N-terminal an die physiologische (PrP^c, hier auch als „Wildtyp“ bezeichnet) und die verlängerte Octarepeat (OR) – Domäne gekoppelt ist:

10

Die verlängerte Octarepeat-Domäne (expOR), d.h. das bindungsspezifische Sequenzmotiv eines erfindungsgemäßen Polypeptids, die bzw. das aus 14 konsekutiven Octameren besteht, wurde aus den folgenden Oligomeren zusammengesetzt und kloniert:

15

ORfwd	GGCTGGGGGGCAGCCCCATGGTGGT	mit 5' - Phosphat
ORrev	CTGCCCCCAGCCACCACCATGGGG	mit 5' - Phosphat
ORrevBamHI	GGATCCGCGCGCGCGC	mit 5' - Phosphat
ORfwdBamHI	GCGCGCGCGCGGATCCCCCATGGTGGT	
20 ORrevEcoRI	TCTCTCTCTCGAATTCTTATCA	
ORfwdEcoRI	GGCTGGGGGGCAGTGATAAGAATTGAGAGAGAGA	
	mit 5' - Phosphat	

20

25

30

Zunächst wurden zur Herstellung eines „Capping“-Fragmentes jeweils 25 µM der Oligonukleotide ORrevBamHI, ORfwdBamHI and ORrev vereinigt und mittels T4-Ligase ligiert (18 h, 16 °C). Dieser „Capping-Mix“ wurde dann in einem molaren Verhältnis von 1:50 zu 20 µM ORrev und ORfwd in 10 mM Tris pH 8 gegeben und für 1 Stunde bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden 250 pmol ORrevBamHI, ORfwdBamHI, ORrevEcoRI und ORfwdEcoRI zugegeben und diese Mischung wiederum mit T4-Ligase ligiert (18 h, 16 °C). Diese Vorgehensweise führte zu einer Reihe von DNA-Fragmenten mit unterschiedlichen Längen der Octarepeat-Domäne. Die Produkte mit einer Länge von 200 bis 500 bp, was ungefähr 8 bis 20

konsekutiven Octameren entspricht, wurden aus einem Agarose-Gel isoliert und mit *Bam*HI and *Eco*RI verdaut.

Das „Wildtyp“-PrP-Octarepeat- (wtOR) Fragment wurde mittels PCR aus dem Vektor pET-11a(SyHaPrP(23-231)) amplifiziert und aus einem Agarose-Gel isoliert. Nach der Reinigung aus dem Agarose-Gelen wurden die verlängerten (expOR) und die „Wildtyp“- (wtOR) DNA-Fragmente im Leseraster mit der kodierenden Region der Glutathion-S-Transferase (GST) in den Expressionsvektor pGEX-4T-3 (Amersham) in die *Bam*HI/*Eco*RI – Schnittstelle kloniert. In diesem Konstrukt ist der GST-Abschnitt (26 kDa) von seinem Fusionspartner durch eine Thrombin-Schnittstelle (LVPRGS) getrennt. Positive Klone wurden mittels automatischer Fluoreszenz-Sequenzierung ermittelt.

GST-OR-Fusionsproteine und ungekoppeltes GST (nur Vektor) wurden in *Escherichia coli* BL21(λDE3) exprimiert. Frische transformierte Zellen wurden in Luria-Bertoni-Medium bis zur mittleren log-Phase angezogen und mit 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid induziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellen geerntet, in 50 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1 mg/ml Lysozym (30 min, 30 °C) lysiert und anschließend 30 Minuten mit DNase I, 5 mM MgCl₂ bei 30°C inkubiert. Mit dem geklärten Lysat (30 min bei 10.000 g) wurde eine Glutathion-Sepharose-Säule (Amersham) beladen, die mit 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.2% Sarkosyl, 1 mM EDTA gewaschen und mit 50 mM Tris pH 8.5, 10 mM reduziertem Glutathion (GSH), 2 mM Dithiothreitol (DTT) bei Raumtemperatur eluiert wurde. Alle GST-Proteine wurden dann mit 50 mM Iodoacetamid für 30 min bei Raumtemperatur behandelt, um freie Cystein-Reste im GST-Abschnitt zu blocken. Anschließend wurden die GST-wtOR- und GST-expOR-Eluat auf 300 mM NaCl gebracht, mittels Filtration geklärt und auf eine Zn²⁺-Nitriloessigsäure-Agarose-Säule geladen (ungefähr 1 und 5 mg Protein pro ml Perlen für GST-expOR bzw. GST-wtOR). Die Metallaffinitätssäule wurde mit 20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 300 mM NaCl gewaschen und mit 20 mM Tris pH 8, 200 mM Imidazol, 300 mM Imidazol eluiert. Nach Zugabe von 5 mM EDTA, wurden GST-wtOR und GST-expOR zweimal gegen Reinstwasser dialysiert (1:100, SnakeSkin, Pierce).

GST, GST-wtOR and GST-expOR wurden in 50 mM NaHCO₃, pH 8.3, 1% NP40 (0.1-0.5 mg/ml Protein, 4 mg Protein pro ml Perlen) für 2 Stunden bei Raumtemperatur kovalent an NHS-aktivierte Sepharose (Amersham) gekoppelt. Die „beads“ wurden in 50 mM Hydroxylamin, pH 7.5 (30 min, Raumtemperatur) geblockt, und nacheinander mit 50 mM Tris, pH 8.8, 50 mM Na-Acetat, pH 4.6, 50 mM HEPES, pH 7.5, 1% Sarkosyl, 2 mM EDTA und dann 50 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.6% NP-40, 0.3% Sarkosyl gewaschen.

Nachweis von PrP^C und PrP^{Sc} in Hirnextract durch GST-Octarepeat-Fusionspeptide:

Homogenate des Gehirns von gesunden oder Scrapie-infizierten Hamstern wurden in 50 mM HEPES/Na-Acetat, pH 7.5/4.6, 300 mM NaCl, 0.6% NP40, 0.3% Sarkosyl (Puffer B/7.5 oder B/4.5) auf 1% (w/v) verdünnt, mit Proteaseinhibitoren (Roche), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 0-200 µM CuSO₄/ZnSO₄ oder 5 mM EDTA (Endkonzentrationen) versetzt und bei 10.000 g geklärt. 500 µl Extrakt wurde mit 20 µl Sepharose-gekoppeltem GST/GST-Octarepeat-Fusionspeptid gemischt und „end-over-end“ über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die „beads“ wurden gewaschen und dann 2x in Probenpuffer für die Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) gekocht. Die Hälfte der mit Scrapie-Extrakt inkubierten „beads“ wurden gekocht, während die andere Hälfte zunächst in 20 µl Puffer B/7.5 mit 100 µg/ml Proteinase K (PK; Merck) für 1 Stunde bei 37 °C (gestoppt mit 5 mM PMSF) inkubiert wurde. Die Proben auf 12.5%igen Criterion-Gelen (Biorad) aufgetrennt und auf Polyvinylidenfluorid geblottet. Alle Blots wurden mit dem monoklonalen Antikörper mAB 3F4, der Hamster-PrP erkennt, entwickelt.

Die Erfindung wird im weiteren durch die folgenden Figuren beispielhaft näher erläutert.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Figur 1 zeigt eine Western-Blot-Analyse der Bindung von PrP^C durch GST-wtOR-Fusionspeptide („Wildtyp“) und erfindungsgemäße Polypeptide

(GST-expOR-Fusionspeptide) in Abhängigkeit von der Metallionen-Konzentration bei physiologischem (A und B) und niedrigem (D) pH-Wert sowie das Lösen der Bindung (C).

- 5 **Figur 2** zeigt eine Western-Blot-Analyse der Bindung von PrP^{Sc} durch GST-wtOR-Fusionspeptide („Wildtyp“) und erfindungsgemäße Polypeptide (GST-expOR-Fusionspeptide) in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Metallionen bei physiologischem (A) und niedrigem (B) pH-Wert.
- 10 **Figur 3** zeigt eine graphische Zusammenfassung der Bindungseigenschaften der GST-OR-Fusionspeptide für „Wildtyp“ (A) und erfindungsgemäße Polypeptide (B).
- 15 **Figur 4** zeigt eine Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der kritischen Länge des Sequenzmotivs, die für die stabile Bindung der erfindungsgemäßen Polypeptide an PrP^{Sc} in Gegenwart von EDTA notwendig ist.
- 20 **Figur 5** zeigt einen Western-Blot zum Nachweis des differentiellen Auswaschens von PrP^C unter Bedingungen, bei denen PrP^{Sc} von terminal kranken Hamstern an immobilisierte erfindungsgemäße Polypeptide gebunden bleibt.
- 25 **Figur 6** zeigt einen Western-Blot zum Nachweis des differentiellen Auswaschens von PrP^C unter Bedingungen, bei denen PrP^{Sc} von gesunden Hamstern 42 Tage nach der Infektion an immobilisierte erfindungsgemäße Polypeptide gebunden bleibt.
- 30 **Figur 7** zeigt einen Western-Blot einer Peptidbank zur Kartierung potentieller Bindungsstellen für das erfindungsgemäße Polypeptid in der Octarepeat – Region des Prionproteins.

Figur 8 zeigt eine weitere Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der kritischen Länge des Sequenzmotivs, die für die stabile Bindung der erfindungsgemäßen Polypeptide an PrP^{Sc} in Gegenwart von EDTA notwendig ist (ED = EDTA, Cu = Kupfer, PK = Proteinase K).

Figur 9 zeigt eine Western-Blot-Analyse zum Nachweis der spezifischen Bindung eines erfindungsgemäßen Polypeptids an eine Subpopulation des PrP^{Sc} (PD = pull down, steht für Präzipitation des PrP^{Sc} mit an Sepharose-Beads gebundenem GST-16OR, PK = Proteinase K).

Figur 1: Bindung von nativem PrP^C durch immobilisierte Polypeptide in Abhängigkeit von Metallionen-Konzentration und pH-Wert.

(A) Bindung von PrP^C durch Sepharose-gekoppeltes freies GST, normales (PrP^C) Maus-PrP (GST-MoPrP(52-98)) und ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit 14 Octameren (GST-MoPrP-14OR(52-98)) in 50 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.6% NP40, 0.3% Sarkosyl in Anwesenheit von 5 mM EDTA (ED) oder 50-200 µM CuSO₄.
(B) dito, aber mit 50-200 µM ZnSO₄.

Die Analyse zeigt, dass sowohl das Polypeptid mit dem physiologischen Sequenzmotiv (GST-MoPrP(52-98)) als auch das erfindungsgemäße Polypeptid (MoPrP-14OR(52-98)) PrP^C aus dem Hirnextract von Hamstern in Anwesenheit von Kupfer- oder Zink-Ionen binden können, während das erfindungsmäße Polypeptid, im Gegensatz zum „normalen“, PrP^C auch in Abwesenheit von Metallionen binden kann.

(C) Bindung von PrP^C durch an GSH-Sepharose gekoppeltes normales (PrP^C) Maus-PrP (GST-MoPrP(52-98)) und erfindungsgemäßes Polypeptid mit 14 Octameren (GST-MoPrP-14OR(52-98)) in 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% DOC, 0-200 µM ZnSO₄ und Ablösen des gebundenen

PrP mit 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.3% Sarkosyl, 10 mM EDTA.

Dieser Versuch zeigt, dass die Bindung zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid bzw. dem „normalen“ Peptid und PrP^C reversibel ist.

(D) Experiment in Bindungspuffer mit 50 mM Na-Acetat, pH 4.6, 5 mM EDTA (ED) oder 50-200 µM CuSO₄. Spuren 1-3: Hirnextrakt und Sepharose-gekoppeltes GST, GST-MoPrP(52-98) und GST-MoPrP-14OR(52-98) wurden mit Kupfer bei pH 7.5 vorinkubiert und dann in Acetat-Puffer bei pH 4.6 kombiniert.

Es zeigt sich hier, dass die Bindung des normalen („Wildtyp“-) Sequenzmotivs an PrP^C bei niedrigem pH-Wert (4.6) auch in Abwesenheit von Kupfer erfolgt, d.h. also von Metallionen unabhängig wird.

Figur 2: Bindung von PrP^{Sc} durch immobilisierte Polypeptide in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zugabe von Protease.

(A) Bindung von PrP^{Sc} aus Hirnextrakt von Scrapie-infiziertem Hamster durch Sepharose-gekoppeltes freies GST, normales („Wildtyp“) Maus-PrP (GST-MoPrP(52-98), wt) und ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit 14 Octameren (GST-MoPrP-14OR(52-98), exp) in 50 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.6% NP40, 0.3% Sarkosyl mit 5 mM EDTA oder 200 µM CuSO₄. Das gebundene Material wurde durch Kochen der „beads“ in SDS-PAGE-Probenpuffer unmittelbar (unten, -PK) oder nach Verdau mit Proteinase K (oben, +PK) abgelöst.

(B) dito, aber in Acetat-Puffer, pH 4.6.

Im Gegensatz zum „Wildtyp“-Sequenzmotiv (4OR) bindet das Sequenzmotiv der erfindungsgemäßen Polypeptide (14OR) das pathologische PrP^{Sc} in Anwesenheit von EDTA bzw. in Abwesenheit von Metallionen bzw. Kupfer bei physiologischem pH-Wert und zwar unabhängig von einem Verdau mit Protease. Es ist ferner zu erkennen, dass die Bindung des erfindungsgemäßen 14OR-Polypeptids an PrP^{Sc}

stärker ist als die Bindung zwischen PrP^{Sc} und dem normalen 4OR-Peptid, da diese einem Verdau mit Protease widersteht.

Figur 3: Zusammenfassung der Bindung von PrP^{C} und PrP^{Sc} unter unterschiedlichen Bedingungen.

Das bindende Sequenzmotiv stellt praktisch eine Art Schalter dar, der die Bindungseigenschaften für PrP^{C} und PrP^{Sc} in Abhängigkeit von Metallionen-Konzentration und pH-Wert steuert. Das Polypeptid bzw. Sequenzmotiv kann dabei unterschiedliche Stellungen bzw. Konformationen annehmen: NULL (pH ~4.5), OFF (ohne Cu/Zn, pH 7.5) oder ON (mit Cu/Zn, pH 7.5). In Abhängigkeit von den Bedingungen kann das Sequenzmotiv PrP^{C} oder PrP^{Sc} entweder schwach (+/-), stark (+) oder überhaupt nicht (-) binden.

(A) normales Peptid (4+1 Octamer)

(B) erfindungsgemäßes Polypeptid bzw. Sequenzmotiv (14 Octamere)

Figur 4: Bestimmung der kritischen Länge des Sequenzmotivs, die für die Präzipitation von PrP^{Sc} in Gegenwart von EDTA notwendig ist.

40 µl Sepharose-„beads“ wurden kovalent mit Polypeptiden mit unterschiedlicher Anzahl von Octameren, hier GST-wtOR (HaPrP(52-98), ca. 5 mg/ml), GST-8OR, GST-10OR oder GST-16OR, gebunden. 1 ml 1% (w/v) Scrapie-infiziertes (263K-Stamm, vorgereinigt bei 10.000 x g, 5 min) Hirnhomogenat eines terminal erkrankten Syrischen Hamsters wurden dann mit den cross-gelinkten Sepharose-Octarepeat-Beads in 50 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5% Sarkosyl, 5 mM EDTA oder 0.2 mM CuSO_4 inkubiert (12h bei 4°C). Die Sepharose-Beads wurden dann in dem Inkubationspuffer gewaschen und in eine Fraktion, die mit Protease (20 µg/ml, 37°C, 30 min) und eine, die ohne Protease behandelt wurde, aufgeteilt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western-Blotting analysiert (Gel: 12.5%, detektiert mit mAB 3F4).

Es wird hier deutlich, dass eine kritische Länge von mindestens 9 Octameren notwendig ist, um ausreichend PrP^{Sc} zu binden, vorzugsweise jedoch mehr als 10 Octamere bzw. Octarepeats, insbesondere 16 Octamere oder mehr.

5

Figur 5: Differentielles Auswaschen von PrP^C unter Bedingungen, bei denen PrP^{Sc} von terminal kranken Hamstern an immobilisierte erfindungsgemäße Polypeptide gebunden bleibt.

10 Experiment wie bei Figur 4, durchgeführt mit immobilisiertem erfindungsgemäßen Polypeptid (GST-16OR) mit verschiedenen finalen Waschschritten, zur Ermittlung der Waschbedingungen, die differentiell PrP^C, aber nicht PrP^{Sc} herunterwaschen.

Waschpuffer (Elutionsbedingungen):

- 15
1. 10 M urea pH3.7
 2. 20 mM HEPES pH 7.5, 0.2% SDS
 3. 20 mM HEPES pH 7.5, 0.5% SDS
 4. 20 mM HEPES pH 7.5, 2% SDS

20 Es wird hier deutlich, dass beispielsweise die Waschpuffer 3 und 4 differentiell PrP^C in die lösliche Phase (S=Überstand) waschen, während PrP^{Sc} immobilisiert (P=Pellet) bleibt. Mittels sehr stringenter Waschbedingungen kann also eine spezifische Unterscheidung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} erfolgen, da die Bindung der erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Sequenzmotive an PrP^{Sc} deutlich stärker ist, als an PrP^C. Nach Durchführung eines geeigneten Waschschrattes oder eines
25 anderen Trennverfahrens, das die unterschiedlichen Assoziationskonstanten ausnutzt, kann also PrP^{Sc} mit Hilfe der erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. des erfindungsgemäßen Verfahrens spezifisch nachgewiesen werden.

30

Figur 6: Differentielles Auswaschen von PrP^C unter Bedingungen, bei denen PrP^{Sc} von gesunden Hamstern nach 2/3 der Inkubationszeit an immobilisierte erfindungsgemäße Polypeptide gebunden bleibt.

GST-16OR (ca. 4 mg/ml) wurde mit 20 µl Sepharose-„Beads“ über Nacht in 1 ml 1% normalem Hamsterhirnhomogenat oder Hirnhomogenat von Hamstern zum Zeitpunkt 42 Tage (von 60 Tagen) nach Inokulation mit Prionen (d.h. die Hamster sind noch neurologisch unauffällig, scheinbar "gesund") inkubiert (Inkubationspuffer: 50 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.6% NP40, 0.3% Sarkosyl). Danach wurden die „Beads“ 3-mal mit Inkubationspuffer gewaschen und anschließend mit 60 µl Elutionspuffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA und unterschiedliche Konzentrationen von SDS: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5%) inkubiert. Das Eluat wurde dann mit SDS-PAGE (12.5% Gel) und Western-Blot (mAB 3F4) dargestellt. (B = Beads, Sup = Überstand)

Es ist zu erkennen, dass die Konzentration an Bead-gebundenem PrP^{Sc} (B) deutlich geringer ist als in Figur 5, was auf die noch geringe Konzentration an PrP^{Sc} in diesem frühen Krankheitsstadium, das noch subklinisch, also symptomfrei ist, zurückzuführen ist. Das meiste PrP ist hier noch PrP^C, das unter den angegebenen Bedingungen herausgewaschen wird. Das Experiment beweist aber, dass das erfindungsgemäße Verfahren bzw. die erfindungsgemäßen Polypeptide geeignet sind, in einem Früherkennungstest, beispielsweise einem ante mortem – Schnelltest von Körperflüssigkeiten, PrP^{Sc} zu detektieren.

Figur 7: Mapping der potentiellen Bindungsstellen für das erfindungsgemäße Polypeptid in der Octarepeat – Region des PrP

Eine Kartierung potentieller Bindungsstellen für das erfindungsgemäße Polypeptid in der Octarepeat – Region des Prionproteins wurde mit Hilfe einer Peptidbank ("gridded array of peptides", Jerini (Berlin)) in Form einer Zellulosemembran, auf der am C-terminus 13mer Peptide des Prionproteins des Syrischen Hamsters immobilisiert sind, welche sequentiell die gesamte PrP Aminosäuresequenz abdecken, d.h. insgesamt sind also 121 Peptide, durchgeführt. Diese Membran wurde wie ein Immunoblot verwendet. GST allein (Negativkontrolle), oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid (GST-14OR) wurde in einer Konzentration von 40 µg/ml zusammen mit Kaninchen-anti-GST-Serum (1:5000) über Nacht bei 4°C

inkubiert, anschließend gewaschen und 30 Minuten mit einem Ziegen-anti-Kaninchen-POD-Antikörper und ECL/Hyperfilm (Amersham) entwickelt.

Es wird hier deutlich, dass GST allein eine gewisse Hintergrundaktivität der Detektionssubstanzen zeigt. GST-14OR bindet aber deutlich an das Hauptepitop WGQPHGGGW bzw. GQPHGGGW oder WGQPHGGG und zwar exakt in der Octarepeat-Region des PrP (Peptide 27/28/29 , 31/32/33, 35/36/37 und 39/40/41; unterstrichen):

10

25 YPPQGGGTWGQPH

26 PQGGGTWGQPHGG

27 GGGTWGQPHGGGW28 GTWGQPHGGGWWGQ

15

29 WGQPHGGGWWGQPH

30 QPHGGGWGQPHGG

31 HGGGWGQPHGGGW32 GGWGQPHGGGWWGQ33 WGQPHGGGWWGQPH

20

34 QPHGGGWGQPHGG

35 HGGGWGQPHGGGW36 GGWGQPHGGGWWGQ37 WGQPHGGGWWGQPH

38 QPHGGGWGQPHGG

25

39 HGGGWGQPHGGGW40 GGWGQPHGGGWWGQ41 WGQPHGGGWWGQGG

42 QPHGGGWGQGGGT

43 HGGGWGQGGGTHN

30

Im Blot ist dabei zu erkennen, dass die Intensität der Bindung mit aufsteigender Nummer der Peptide jeweils abnimmt.

Figur 8: Bestimmung der kritischen Länge des Sequenzmotivs, die für die Präzipitation von PrP^{Sc} in Gegenwart von EDTA notwendig ist.

Um die in Figur 4 gezeigten Ergebnisse zu bestätigen, wurde PrP^{Sc} mit immobilisierten erfindungsgemäßen Polypeptiden (GST-OR) mit unterschiedlicher Anzahl an Octameren aus Hirnextrakten von mit Scrapie infizierten Hamstern (SchHa) präzipitiert. Zu diesem Zweck wurde Hirnhomogenat (20% w/v) von SchHa mit Bindungspuffer, der entweder 50-200 mM CuSO₄/ZnSO₄ oder 5 mM EDTA enthielt, auf 1% verdünnt und dann durch Zentrifugation geklärt. Zu dem Überstand (Hirnextrakt) wurden Sepharose-Beads gegeben, die kovalent mit GST-OR gekoppelt waren, wobei die Polypeptide vier (GST-4OR), acht (GST-8OR), zehn (GST-10OR) oder sechzehn (GST-16OR) Octamere enthielten. Nach Inkubation über Nacht (4°C) wurden die Sepharose-Beads gewaschen und entweder direkt gekocht oder vorher mit 20 µg/ml Proteinase K (PK; Merck) für 1 Stunde bei 37°C in Bindungspuffer mit 5mM EDTA verdaut (gestoppt mit 5 mM PMSF). Die Proben wurden in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und der Western-Blot mit α-PrP mAB 3F4 entwickelt.

Figur 8 zeigt einen klaren Grenzwert der PrP^{Sc}-Bindung durch die erfindungsgemäßen Polypeptide zwischen acht und zehn Octameren. Dabei inhibiert Kupfer die Bindung an PrP^{Sc} sowohl bei GST-10OR als auch GST-16OR. Dieses Ergebnis bestätigt also die in Figur 4 gezeigten Resultate, d.h. es existiert eine kritische Octarepeat-Länge, bei der die Bindungseigenschaften der erfindungsgemäßen Polypeptide von keiner PrP^{Sc}-Bindung auf vollständige PrP^{Sc}-Bindung umschlägt.

Figur 9: Nachweis der spezifischen Bindung eines erfindungsgemäßen Polypeptids an eine Subpopulation des PrP^{Sc}.

Bei der zu Figur 8 beschriebenen Präzipitation von PrP^{Sc} durch immobilisiertes GST-16OR wurde überraschender Weise festgestellt, dass zumindest dieses erfindungsgemäße Polypeptid ausschließlich einen geringen Anteil der Gesamtmenge des PK-resistenten PrP^{Sc} in einer Probe bindet (PK = Proteinase

K). Eine Quantifizierung des Präzipitats mittels ELISA ergab, dass der Anteil des PrP^{Sc}, der durch GST-16OR gebunden wird, ca. 4% der Gesamtmenge des im Hirnextrakt vorliegenden PK-resistenten PrP^{Sc} ausmacht, wobei das Hirnextrakt 70% des gesamten, im Hirn der infizierten Hamster vorliegenden PK-resistenten PrP^{Sc} enthält. Figur 9 zeigt, dass kein weiteres PK-resistentes PrP^{Sc} mehr gebunden wird (siehe Spur „2nd PD“), wenn der Überstand des ersten Präzipitationsexperiments („1st PD“) erneut mit immobilisiertem GST-16OR behandelt wird. Bereits durch die erste Präzipitation mit immobilisiertem GST-16OR wurde also eine bestimmte Art oder Subpopulation, möglicherweise eine besondere Faltungsform, des PrP^{Sc} nahezu vollständig aus dem Hirnextrakt entfernen. Da diese Subpopulation nach intracerebraler Inokulation in Hamster eine signifikant kürzere Inkubationszeit im Vergleich zu Kontrollexperimenten (GST-4OR- oder GST- Präzipitat) zeigt, ist die GST-16OR-spezifische Subpopulation des PrP^{Sc} mit der Infektiösität der Prione korreliert.

Das erfindungsgemäße Polypeptid GST-16OR bzw. das Sequenzmotiv 16OR ist also spezifisch für eine spezielle Art bzw. Subpopulation des PrP^{Sc} und kann folglich in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung auch für den Nachweis bzw. die spezifische Bindung zumindest einer besonderen, infektiösen Subpopulation des PrP^{Sc} verwendet werden.

Referenzen:

- 5 Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., *et al.* (1997). The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* 390, 684-687.
- Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S. B., Antholine, W. E.,
10 Gerfen, G. J., Peisach, J. & Millhauser, G. L. (2003) Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry*. 42, 6794-803.
- Campbell, T. A., Palmer, M. S., Will, R. G., Gibb, W. R. G., Luthert, P. J., and Collinge, J. (1996). A prion disease with a novel 96-base pair insertional mutation
15 in the prion protein gene. *Neurology* 46, 761-766.
- Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B. & Harris, D. A. (1998) Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21, 1339-1351.
20
- Chiesa, R., Drisaldi, B., Quaglio, E., Migheli, A., Piccardo, P., Ghetti, B. & Harris, D. A. (2000) Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 5574-5579.
25
- Collinge, J., Brown, J., Hardy, J., Mullan, M., Rossor, M. N., Baker, H., Crow, T. J., Lofthouse, R., Poulter, M., Ridley, R., *et al.* (1992). Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 2. Clinical and pathological features. *Brain* 115, 687-710.
30
- Garnett, A. P., and Viles, J. H. (2003). Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J Biol Chem* 278, 6795-6802.

Hornshaw, M. P., McDermott, J. R., and Candy, J. M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 621-629.

- 5 Owen, F., Poulter, M., Lofthouse, R., Collinge, J., Crow, T. J., Risby, D., Baker, H. F., Ridley, R. M., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1989). Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1, 51-52.

Safar, J. et al. (1998), *Nature Med.* 4, 1157-1165.

10

Stöckel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1998). Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochemistry* 37, 7185-7193.

15

Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2042-2047.

Patentansprüche

1. Polypeptid mit zumindest einem löslichen Bestandteil und mindestens einem Sequenzmotiv, das aus mindestens 9 aufeinanderfolgenden Octameren einer mit dem Kupfer-bindenden, repetitiven Octamer eines Prionproteins (PrP) zumindest homologen und/oder überlappenden Aminosäuresequenz besteht.
2. Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest ein Octamer aus der Gruppe der Aminosäuresequenzen gemäß Seq ID Nrn. 9 bis 24 ausgewählt ist.
3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch eine Struktur, die derart ausgebildet ist, dass sie spezifisch an die Aminosäuresequenz Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp oder eine sich, vorzugsweise 4-mal, wiederholende Abfolge dieser Sequenz bindet.
4. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch eine Struktur, die derart ausgebildet ist, dass sie spezifisch an die Aminosäuresequenz Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp oder eine sich, vorzugsweise 4-mal, wiederholende Abfolge dieser Sequenz bindet.
5. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch eine Struktur, die derart ausgebildet ist, dass sie spezifisch an die Aminosäuresequenz Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly oder eine sich, vorzugsweise 4-mal, wiederholende Abfolge dieser Sequenz bindet.
6. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Sequenzmotiv aus 10 bis 32, vorzugsweise 14 oder 16, Octameren besteht.
7. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der lösliche Bestandteil Glutathion-S-Transferase (GST) ist.

8. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass dieses mit einer der Aminosäuresequenzen gemäß Seq ID Nrn. 1 bis 8 zumindest 90 % Homologie aufweist.
9. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet durch einen zusätzlich gebundenen, detektierbaren Bestandteil, vorzugsweise einen fluoreszierenden, radioaktiven oder enzymatisch nachweisbaren Bestandteil.
10. Nukleinsäuremolekül, mit einer Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid kodiert, wobei die Nukleotidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Isolierte oder künstliche Nukleotidsequenz, welche für das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kodiert,
 - b) Nukleotidsequenz, die zusätzlich zu einer Sequenz, die für ein lösliches Polypeptid kodiert, zumindest 9 aufeinanderfolgende Abschnitte gemäß Seq ID Nr. 25 als Insert enthält,
 - c) Nukleotidsequenz, welche sich von den Nukleotidsequenzen gemäß a) oder b) durch den Austausch zumindest eines Codons gegen ein synonymes Codon unterscheidet.
11. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 10, wobei das Nukleinsäuremolekül operativ mit zumindest einem regulatorischen Element verknüpft ist.
12. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 11, wobei das regulatorische Element eine Promotorsequenz und/oder eine Transkriptionsterminationssequenz umfasst.
13. Vektor zur Expression eines Polypeptids in einer geeigneten Zelle, wobei dieser das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 10, 11 oder 12 in exprimierbarer Form enthält.

14. Zelle, welche das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9, das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 10, 11 oder 12 und/oder den Vektor nach Anspruch 13 enthält.
15. Antigenbindendes Peptid, insbesondere Antikörper oder Fragmente von Antikörpern, welches spezifisch an das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 bindet.
16. Kit, welches das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9, das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 10, 11 oder 12, den Vektor nach Anspruch 13, zumindest eine Zelle nach Anspruch 14 und/oder das antigenbindende Peptid nach Anspruch 15 enthält.
17. Verwendung des Kits nach Anspruch 16 zum Nachweis der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}).
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9, das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 10, 11 oder 12, den Vektor nach Anspruch 13 und/oder das antigenbindende Peptid nach Anspruch 15, sowie vorzugsweise übliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe, enthält.
19. Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 18 zur therapeutischen oder präventiven Behandlung von spongiformen Enzephalopathien.
20. Verfahren zur spezifischen Bindung der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) an ein Biomolekül, wobei die Bindung durch Inkubation des Biomoleküls mit einer auf die Anwesenheit des pathologischen Prionproteins zu untersuchenden Probe durchgeführt wird, dadurch gekennzeichnet, dass als Biomolekül zumindest das Sequenzmotiv des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 9 eingesetzt wird und dass die Inkubation unter Anwesenheit einer chelatbildenden Substanz erfolgt, wobei die Fraktion der Probe mit dem gebundenen pathologischen Prionprotein

(PrP^{Sc}) anschließend von der Fraktion der Probe mit gebundenen normalen Prionprotein (PrP^C) getrennt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass als chelatbildende Substanz ein Komplexbildner für divalente Kationen, vorzugsweise Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), zugegeben wird.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennung der Fraktionen durch Waschen mit einer Lösung erfolgt, die 0,1 bis 2,0 % Natriumdodecylsulfat (SDS), vorzugsweise 0,5 % SDS, und/oder 1 bis 10 mol/l Harnstoff enthält.
23. Verfahren nach Anspruch 20, 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass das durch das Biomolekül gebundene Prionprotein durch die anschließende spezifische Bindung eines detektierbaren Moleküls nachgewiesen wird oder dass das durch das Prionprotein gebundene Biomolekül durch die anschließende spezifische Bindung eines detektierbaren Moleküls, insbesondere des antigenbindenden Peptids nach Anspruch 15, nachgewiesen wird.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das detektierbare Molekül ein, vorzugsweise monoklonaler, Antikörper oder ein Fragment eines Antikörpers ist, der/das spezifisch an das Prionprotein oder das Biomolekül bindet.
25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis des pathologischen Prionproteins (PrP^{Sc}) mittels ELISA, Westernblotting oder Dipstick-Technologie erfolgt.
26. Verfahren nach Anspruch 20, 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass das pathologische Prionprotein (PrP^{Sc}) durch die Bindung an das, vorzugsweise immobilisierte, Biomolekül konzentriert oder aufgereinigt wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung des Prionproteins an das Biomolekül bei einem pH-Wert > 7, vorzugsweise pH 7,5, durchgeführt wird.
28. Verwendung des Sequenzmotivs des Polypeptids nach einem Ansprüche 1 bis 9 in immobilisierter Form zum Nachweis der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) oder zur Reinigung einer mit der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) infizierten Probe.
29. Verwendung des Polypeptids und/oder des Sequenzmotivs des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Erhöhung der Sensitivität von Bioassays.
30. Verwendung des Polypeptids und/oder des Sequenzmotivs des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zum Nachweis einer Subpopulation der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) oder zur Reinigung einer mit einer Subpopulation der pathologischen Isoform eines Prionproteins (PrP^{Sc}) infizierten Probe.

FIG. 1

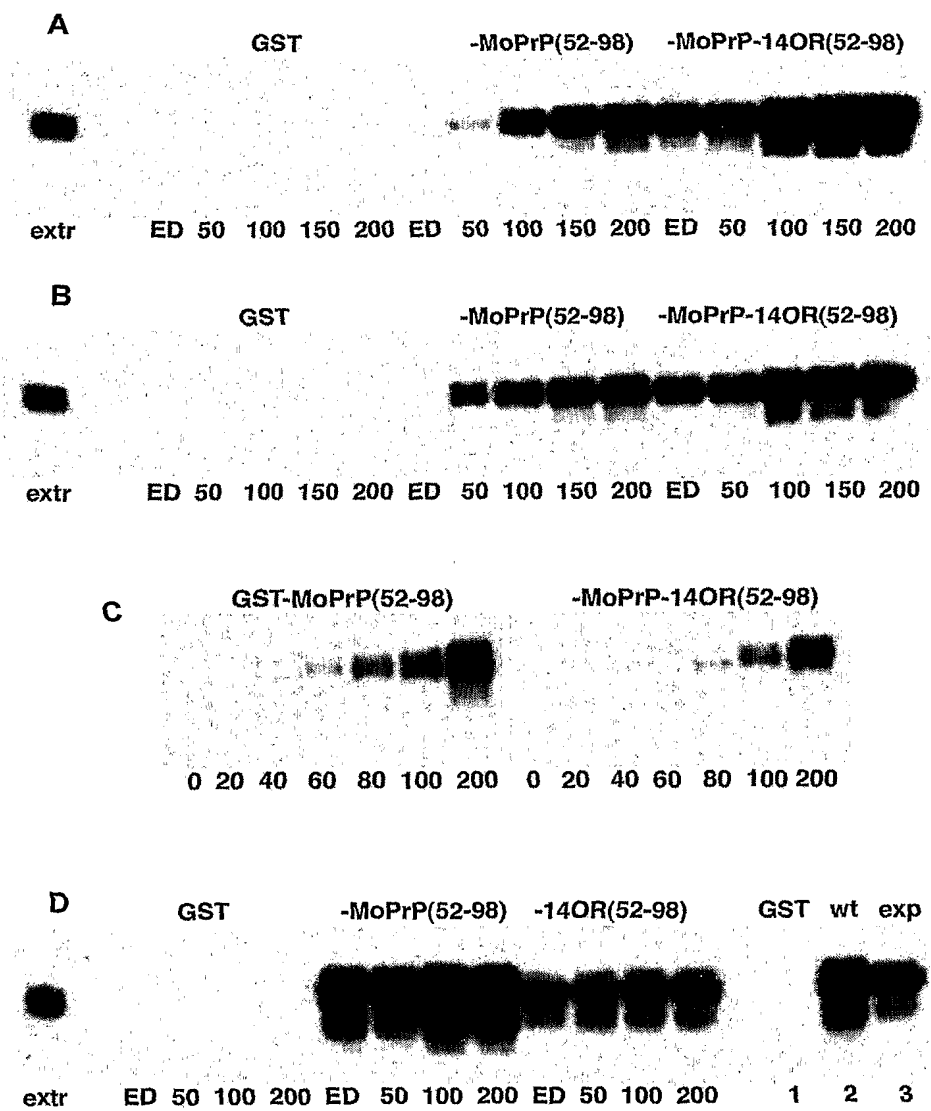


FIG. 2

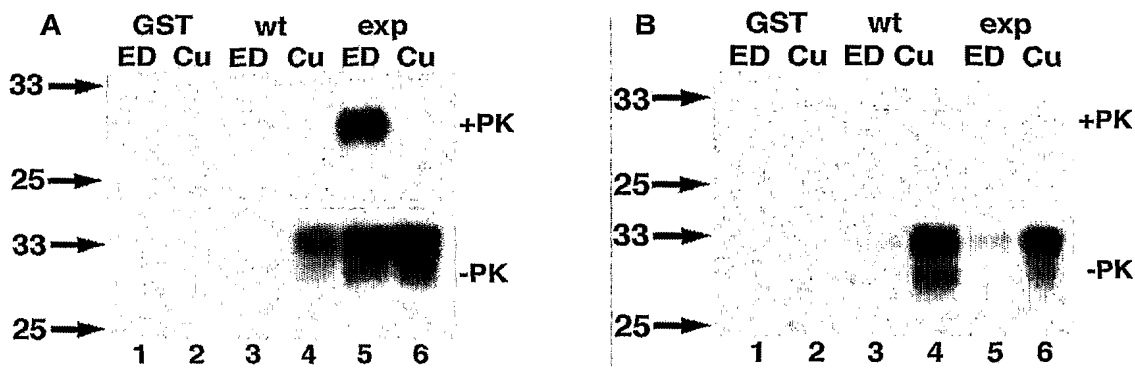


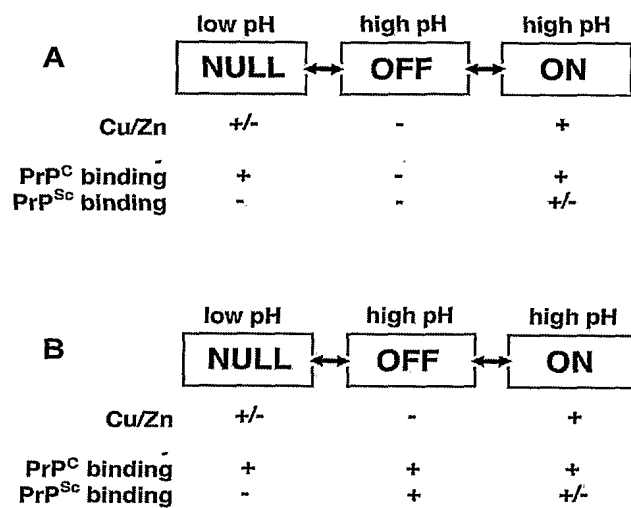
FIG. 3

FIG. 4

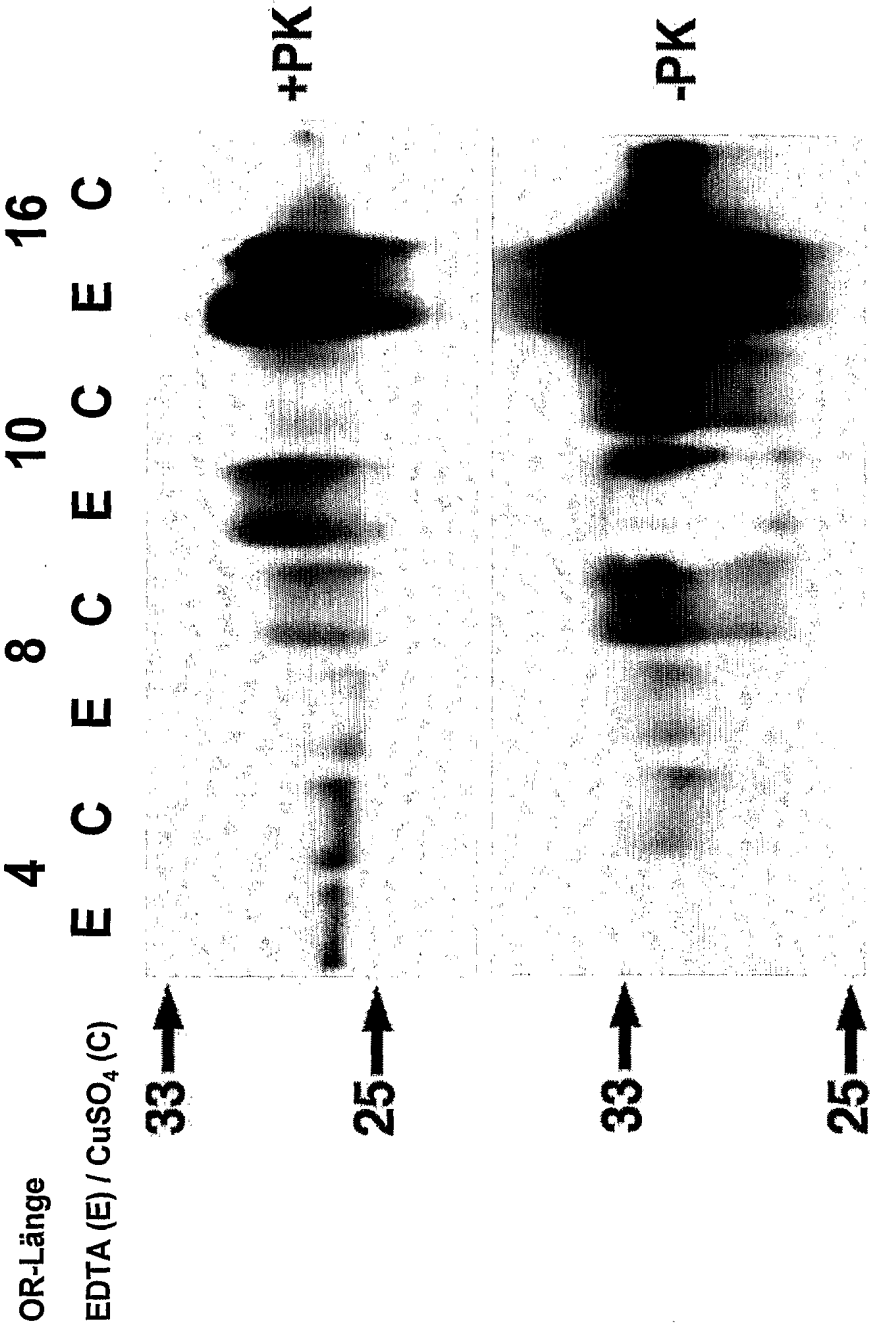


FIG. 5

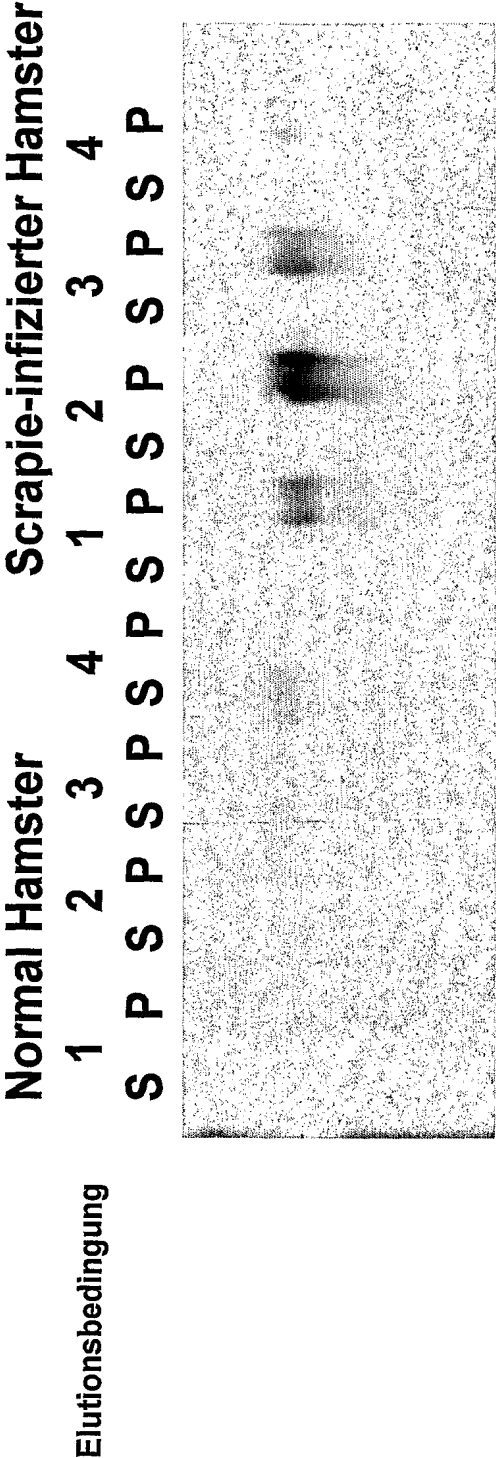


FIG. 6

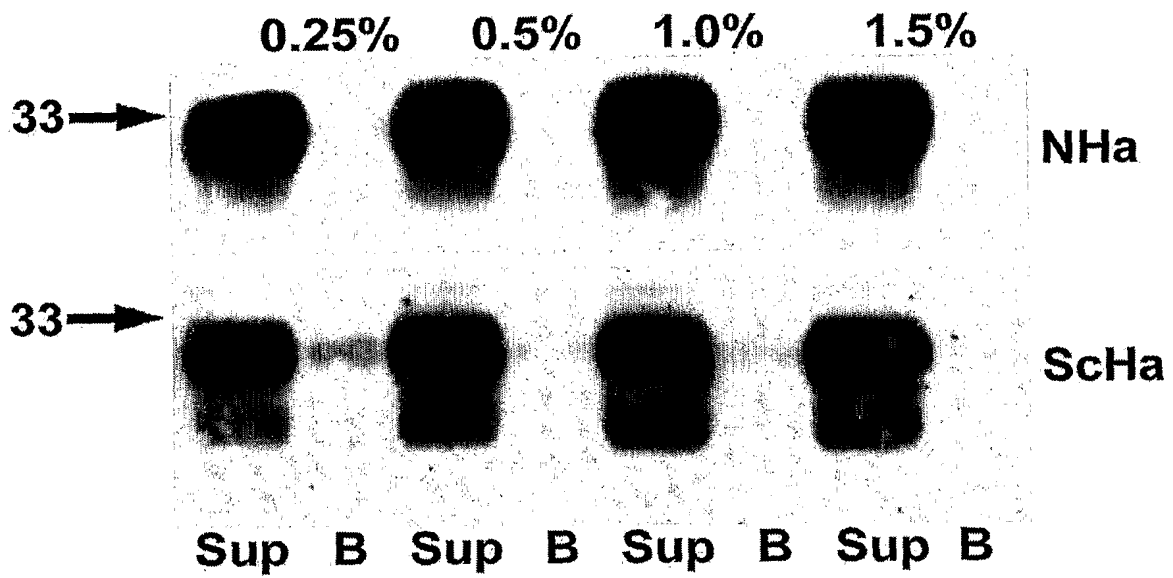


FIG. 7

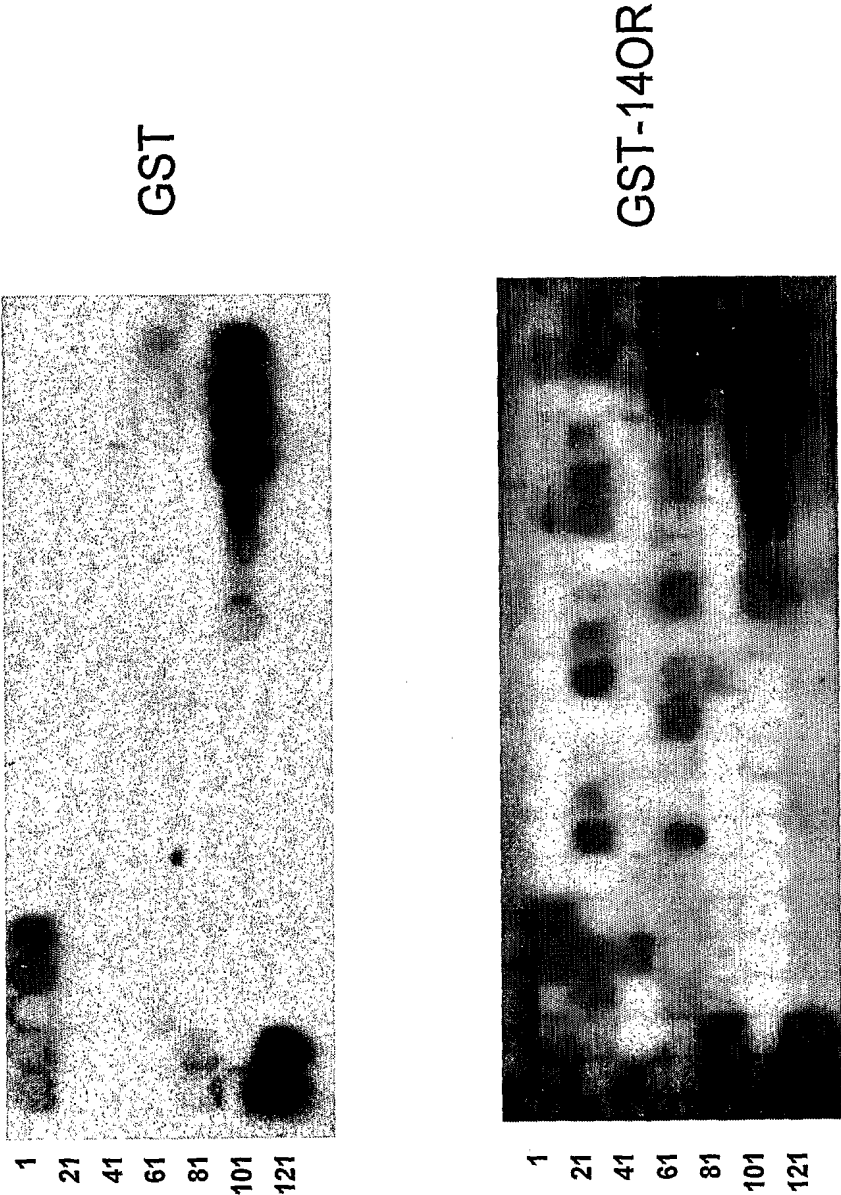


FIG. 8

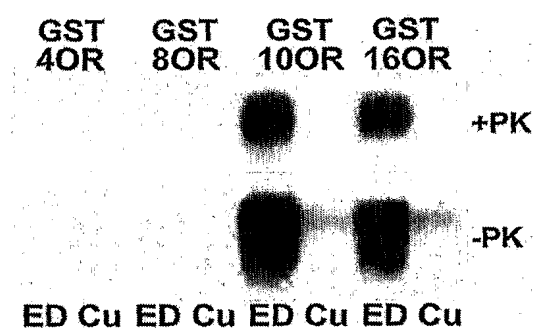
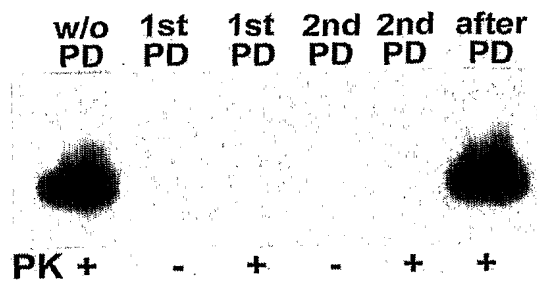


FIG. 9

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

<120> Polypeptide und Verfahren zur spezifischen Bindung von
Prionen

<130> A02 147 PCT

<140>

<141>

<150> DE 10 2004 043 782.3

<151> 2004-09-08

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 343

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Erfindungsgemäßes Polypeptid, GST-Fusionspeptid
mit 13 Octameren im Sequenzmotiv (GST-13OR)

<400> 1

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr
 195 200 205

Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly
 210 215 220

Ser Gln Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 225 230 235 240

Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 245 250 255

Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 260 265 270

Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 275 280 285

Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 290 295 300

Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 305 310 315 320

Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 325 330 335

Gly Gly Gly Thr His Asn Gln
 340

<210> 2

<211> 351

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Erfindungsgemäßes Polypeptid, GST-Fusionspeptid
mit 14 Octameren im Sequenzmotiv (GST-14OR)

<400> 2

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
180 185 190

Leu Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr
 195 200 205
 Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly
 210 215 220
 Ser Gln Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 245 250 255
 Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 260 265 270
 Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 275 280 285
 Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 290 295 300
 Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 305 310 315 320
 Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
 325 330 335
 Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn Gln
 340 345 350

<210> 3

<211> 306

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Beschreibung
 der künstlichen Sequenz : Erfindungsgemäßes
 Polypeptid, GST-Fusionspeptid mit 10 Octameren im
 Sequenzmotiv (GST-10OR)

<400> 3

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95
 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110
 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220
 Gly Ser Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 245 250 255
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 260 265 270
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 275 280 285

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 290 295 300

Gly Gln
 305

<210> 4
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Erfindungsgemäßes Polypeptid, GST-Fusionspeptid
 mit 11 Octameren im Sequenzmotiv (GST-11OR)

<400> 4
 Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30
 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95
 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110
 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220

Gly Ser Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 225 230 235 240

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 245 250 255

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 260 265 270

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 275 280 285

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 290 295 300

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 305 310

<210> 5

<211> 322

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Erfindungsgemäßes Polypeptid, GST-Fusionspeptid
 mit 12 Octameren im Sequenzmotiv (GST-12OR)

<400> 5

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95
 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110
 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220
 Gly Ser Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 245 250 255
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 260 265 270
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 275 280 285

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 290 295 300

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 305 310 315 320

Gly Gln

<210> 6

<211> 346

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Erfindungsgemäßes Polypeptid, GST-Fusionspeptid
 mit 15 Octameren im Sequenzmotiv (GST-15OR)

<400> 6

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220
 Gly Ser Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 245 250 255
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 260 265 270
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 275 280 285
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 290 295 300
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 325 330 335
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 340 345

<210> 7

<211> 354

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Erfindungsgemäßes Polypeptid, GST-Fusionspeptid
mit 16 Octameren im Sequenzmotiv (GST-16OR)

<400> 7

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1             5             10             15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
      20             25             30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
      35             40             45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50             55             60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65             70             75             80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
      85             90             95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
      100             105             110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
      115             120             125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
      130             135             140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
      145             150             155             160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
      165             170             175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
      180             185             190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
      195             200             205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
      210             215             220

Gly Ser Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
      225             230             235             240

```

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 245 250 255

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 260 265 270

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 275 280 285

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 290 295 300

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 305 310 315 320

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 325 330 335

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 340 345 350

Gly Gln

<210> 8

<211> 298

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Erfindungsgemäßes Polypeptid, GST-Fusionspeptid
 mit 9 Octameren im Sequenzmotiv (GST-9OR)

<400> 8

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220

Gly Ser Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 225 230 235 240

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 245 250 255

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 260 265 270

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 275 280 285

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
 290 295

<210> 9

<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer1
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 9
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 2
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 10
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 3
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 11
Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 4

für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 12

Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp

1

5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 5
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 13

Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly

1

5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 6
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 14

Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly

1

5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 7
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 15

Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln

1

5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 8
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 16

Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln

1

5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 9
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 17

His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro

1

5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 10
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 18

His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro

1

5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 11
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 19

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 12
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 20

Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 13
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 21

Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 14
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 22

Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly

1

5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 15
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 23

Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly

1

5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Octamer 16
für Sequenzmotiv des erfindungsgemäßen Polypeptids

<400> 24

Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly

1

5

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Insert
für ein Octamer

<400> 25

ccocatgggtg gtggctgggg gcag

24

<210> 26

<211> 355

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Insert
für Sequenzmotiv mit 14 Octameren, mit BamHI (5')
und EcoRI (3') Schnittstellen und 2 Stopcodons

<400> 26

```
ggatcccccc atggtggtgg ctgggggcag ccccatggtg gtggctgggg gcagccccat 60
ggtggtggct gggggcagcc ccatggtggt ggctgggggc agcccatgg tggaggctgg 120
gggcagcccc atggtggtgg ctgggggcag ccccatggtg gtggctgggg gcagccccat 180
ggtggtggct gggggcagcc ccatggtggt ggctgggggc agcccatgg tggaggctgg 240
gggcagcccc atggtggtgg ctgggggcag ccccatggtg gtggctgggg gcagccccat 300
ggtggtggct gggggcagcc ccatggtggt ggctgggggc agtgataaga attcc      355
```